



**Kerman University of Medical Sciences
Faculty of Pharmacy**

PharmD Thesis

Title:

Evaluation of the neuroprotective effect of biogenic selenium nanoparticles on cisplatin-induced neurotoxicity in PC12 cell line

By:

Behnoosh Akbari-Javar

Supervisors:

**Dr. Mojtaba Shakibaie
Dr. Hamid-Reza Rahimi**

Advisor:

Dr. Hamid Forootanfar



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی اثر محافظت نوروئی نانوذرات سلنیوم بیوژنیک بر سمیت عصبی

القا شده توسط سیس پلاتین در رده سلولی PC12

توسط:

بهنوش اکبری جور

اساتید راهنما:

دکتر مجتبی شکیبایی


دکتر حمیدرضا رحیمی

استاد مشاور:

دکتر حمید فروتن فر

اظهارنامه و حق انتشار

اینجانب بهنوش اکبری جور متعهد می شوم موارد مذکور در این پایان نامه حاصل فعالیت های پژوهشی خود بوده و مسئولیت صحت داده ها و اطلاعات گزارش شده در این پایان نامه را به عهده می گیرم. تمامی حقوق مادی و معنوی این پایان نامه متعلق به دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان بوده و هر گونه استفاده تنها با کسب اجازه ممکن خواهد بود. استناد به مطالب و نتایج این پایان نامه در صورتی که به نحو مناسبی ارجاع داده شود، بلامانع است.

امضاء دانشجو

تاریخ
۹۸، ۷، ۱۴

Abstract

Introduction: Cancer is between the leading causes of death worldwide. Current cancer treatment is the use of chemotherapy and one the most chemotherapy medication such as cisplatin (CP). Neurotoxicity is one of the side effects of this drug. Several mechanisms for cisplatin toxicity, including increased oxidative stress has reported. Several studies have shown the neuroprotective effect of selenium nanoparticles (Se Nps). Due to adverse effects of chemical compounds used for synthesis of nanoparticles (NP), eco-friendly process for the production of Se NPs attracts much attention to itself. In this study, at first, the synthesis and purification and determination the concentration of Se NPs, and then compare the cytotoxicity of Se NPs and sodium selenite on the PC12 cell line was studied. Next, the effects of Se NPs lonely and in the presence of cisplatin and cisplatin lonely on the PC12 cell line was investigated. Finally, the effect of simultaneous treatment of Se NPs and cisplatin on caspase-3 activity was done.

Methods: *Bacillus sp.* MSh-1, a selenium ion reducing bacteria strain was selected and applied for biosynthesis of Se NPs. Thereafter, an organic-aqueous partitioning system was employed for purification of the biogenic Se NPs. In the next step, PC12 cells were treated in 2 plates (Se NPs in compare with sodium selenite and cisplatin lonely) separately with biologically synthesized Se NPs, sodium selenite and cisplatin for 24 hours and corresponding IC₅₀ were determined by analyzing MTT assay results. The effect of Se NPs on glutathione SH level to discover the concentration of Se NPs that produce the highest levels of GSH was evaluated; we investigated different concentrations of Se NPs. To discover the neuroprotective effects of Se NPs and CP in combination, the cells were treated with CP (80 µg/ml) and Se NPs (10 µg/ml) contemporary and cell viability was calculated after 24 hours. To understand mechanisms of action of Se NPs, cell signaling pathways such as apoptosis were perused by ELISA kit caspase-3.

Results: Comparing cytotoxic effect of Se NPs and sodium selenite on PC12 cell line showed that the toxicity of Se NPs was lower than that of sodium selenite. The amount of IC₅₀ of Se NPs and sodium selenite against PC12 cell line was 41.9 and 26.3 µg/ml, respectively. For measuring the concentration of Se NPs that produce the highest levels of GSH, PC12 cells were treated with different concentrations of Se NPs (2-40 µg/ml). The highest level of GSH was measured at concentration of 10 µg/ml of the Se NPs. The survival percent in the PC12 cell line which was exposed to Se NPs, was calculated

and evaluated. The measured IC₅₀ for cisplatin and Se NPs was 82.9 µg/ml and for 41.9 µg/ml, respectively. PC12 cells treated simultaneously with sub-IC₅₀ concentration of Se NPs (10 µg/ml) and cisplatin at a concentration of 80 µg/ml, exhibited increasing in the survival percent. Furthermore, 10 µg/ml of Se NPs reduced the activity of caspase-3 enzyme from cell death in the presence of CP (80 µg/ml).

Conclusion: This study demonstrated the significant neuroprotective effects of Se NPs at a concentration of 10 µg/ml resulting in increasing in the survival percent against the neurotoxicity induced by cisplatin and prevention of apoptosis in the PC12 cell line. Therefore, using biogenic Se NPs, as a potent neuroprotective agent, with cisplatin can be a good idea to add to chemotherapy regimens which merits further investigation.

Keywords: Cisplatin, Neurotoxicity, Biogenic, Se NPs, PC12 Cell Line, Neuroprotective.

خلاصه فارسی

مقدمه: سرطان یکی از دلایل مرگ‌ومیر در جهان به حساب می‌آید. در حال حاضر یکی از درمان‌های سرطان، استفاده از داروهای شیمی‌درمانی مثل سیس پلاتین است. یکی از عوارض جانبی این دارو، سمیت عصبی است. مکانیسم‌های مختلفی برای سمیت عصبی، از جمله افزایش استرس اکسیداتیو ذکر شده است. مطالعات متعدد اثرات محافظت عصبی نانوذرات سلنیوم را نشان داده‌اند. به دلیل اثرات جانبی ترکیبات شیمیایی مورد استفاده برای نانوذرات، روش‌های بیوژنیک برای تولید این نانوذرات توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در ابتدا، سنتز، خالص‌سازی و تعیین غلظت نانوذرات سلنیوم انجام شد و سپس سمیت نانوذرات سلنیوم و سدیم سلنیت بر روی سلول‌های PC12 بررسی شد. سپس، اثر نانوذرات سلنیوم به تنهایی و در حضور سیس پلاتین و سیس پلاتین به تنهایی بر روی سلول PC12 بررسی شد و در نهایت تأثیرات درمان همزمان نانوذرات سلنیوم و سیس پلاتین بر فعالیت caspase-3 بررسی شد.

روش‌ها: باکتری *Bacillus sp. MSH-1*، از سویه‌های باکتری‌های احیاکننده سلنیوم که قبلاً بررسی شده انتخاب شد و پس از آن از یک سیستم جداسازی آلی-آبی برای خالص‌سازی نانوذرات سلنیوم بیوژنیک استفاده شد. سپس سلول‌های PC12 در معرض نانوذرات سلنیوم، سدیم سلنیت و سیس پلاتین به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند و سمیت سلولی مربوط به هر کدام توسط تست MTT مشخص شد. پس از آن سلول‌های PC12 به‌طور جداگانه در ۲ پلیت (نانوذرات سلنیوم در مقایسه با سلنیت سدیم و سیس پلاتین به تنهایی) با نانوذرات سلنیوم بیوژنیک، سدیم سلنیت و سیس پلاتین به مدت ۲۴ ساعت تحت درمان قرار گرفتند و IC50 مربوطه با تجزیه و تحلیل نتایج MTT تعیین شد. برای ارزیابی تأثیر نانوذرات سلنیوم بر سطح گلوپاتیون SH برای پیدا کردن غلظتی از نانوذرات

سلنیوم که بالاترین میزان GSH را تولید می‌کند، غلظت‌های مختلف نانوذرات سلنیوم (۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بررسی شدند. برای کشف اثرات محافظت‌کننده عصبی، سلول‌ها با سیس پلاتین (۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و نانوذرات سلنیوم (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) مواجه و درصد زنده‌مانی آن‌ها پس از ۲۴ ساعت محاسبه شد. برای درک مکانیسم‌های عملکرد آن‌ها، مسیرهای سیگنالینگ سلولی مانند آپوپتوز توسط کیت ELISA caspase-3 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: مقایسه اثرات سیتوتوکسیک نانوذرات سلنیوم و سلنیت سدیم بر روی سلول PC12 نشان داد که سمیت نانوذرات سلنیوم کمتر از سدیم سلنیت است. مقدار IC_{50} برای نانوذرات سلنیوم و سدیم سلنیت به ترتیب $41/9 \mu g/ml$ و $26/3 \mu g/ml$ است. برای پیدا کردن غلظتی از نانوذرات سلنیوم که بالاترین سطوح GSH را تولید می‌کند، غلظت‌های مختلفی از نانوذرات سلنیوم (۲-۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در معرض سلول‌های PC12 قرار گرفتند که از بین آن‌ها غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات سلنیوم بیشترین میزان GSH را سبب شد. میزان زنده‌مانی در سلول PC12 در مواجهه با سیس پلاتین و نانوذرات سلنیوم بیوژنیک محاسبه و ارزیابی شد. مقادیر IC_{50} برای سیس پلاتین و نانوذرات سلنیوم به ترتیب $82/9$ و $41/9$ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. مواجهه نانوذرات سلنیوم بیوژنیک در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با سیس پلاتین در غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب افزایش میزان زنده‌مانی و اثر محافظتی روی سلول‌های PC12 می‌شود. همچنین ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات سلنیوم بیوژنیک فعالیت آنزیم caspase-3 از واسطه‌های مرگ سلولی در حضور سیس پلاتین (۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را کاهش داد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اثرات محافظت‌کننده عصبی معناداری از نانوذرات سلنیوم بیوژنیک در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که منجر به افزایش میزان زنده ماندن در برابر سمیت عصبی ناشی از

سیس پلاتین و جلوگیری از آپوپتوز در سلول PC12 می‌شود را نشان داد. بنابراین استفاده از نانوذرات سلنیوم بیوزنیک و ترکیب آن‌ها با داروی سیس پلاتین به عنوان عوامل مؤثر بر محافظت عصبی می‌تواند ایده خوبی برای اضافه شدن به رژیم‌های شیمی‌درمانی برای کاهش عوارض عصبی داروی سیس پلاتین باشد که به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

کلمات کلیدی: سیس پلاتین، سمیت عصبی، بیوزنیک، نانوذرات سلنیوم، رده سلولی PC12، محافظت عصبی.



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی

پایان نامه خانم بهنوش اکبری جور دانشجوی داروسازی ورودی ۹۱ به شماره : ۱۱۲۷

تحت عنوان:

"بررسی اثر محافظت نوروئی نانوذرات سلنیوم یوژنیک بر سمیت عصبی القا شده توسط داروی سیس پلاتین در دانه"

سلولی PC12

استاد راهنما:

۱- دکتر مجتبی شکیبایی

۲- دکتر حمیدرضا رحیمی

استاد مشاور:

۳- دکتر حمید فروتن فر

هیئت محترم داوران به ترتیب حروف الفبا:

۱- دکتر آزاده امین راده

۲- دکتر بهزاد بهنام

۳- دکتر صالحه صبوری

۱۹۲۵

در تاریخ ۹۸/۰۷/۱۴ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) به تصویب رسید.
(با حروف).....

دکتر مصطفی پورنامداری
رئیس اداره پایان نامه

دکتر محمودرضا حیدری
رئیس دانشکده

